



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 14 219 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 12 Q 1/00
C 12 Q 1/02
C 12 M 1/34

⑳ Aktenzeichen: 197 14 219.2
㉔ Anmeldetag: 7. 4. 97
㉕ Offenlegungstag: 8. 10. 98

DE 197 14 219 A 1

㉑ **Anmelder:**
Friedrich, Cornelius, Prof. Dr., 44227 Dortmund, DE;
Heinze, Ute, 44225 Dortmund, DE

㉒ **Erfinder:**
gleich Anmelder

⑤6 **Entgegenhaltungen:**

US	54 05 764
US	53 14 814
US	51 37 818
US	47 91 061

Datenbank WPIDS bei STN: AN 89-147770/20 zu
JP 01-091050 A;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 **Verfahren und Vorrichtung zur Aktivitätsbestimmung immobilisierter Mikroorganismen**

⑤7 Die Atmungsaktivität immobilisierter Mikroorganismen wird bisher manometrisch bestimmt. Der Stoffübergang von der Gasphase in die Flüssigphase kann dabei die mikrobielle Aktivität begrenzen. Dampfdruckverändernde Prüfsubstanzen erzeugen bei den verfügbaren Apparaturen scheinbare Sauerstoffverbrauchsraten, die Meßdauer beträgt mehrere Stunden, und die Geräte sind teuer. Mit dem neuen Verfahren werden die Atmungsaktivitäten von immobilisierten Mikroorganismen ohne den genannten Stoffübergang bestimmt. Meßergebnisse sind schnell und reproduzierbar. Die Meßapparatur ist transportabel und kostengünstig. Das Meßverfahren gestattet die Übertragung der Ergebnisse auf die mikrobielle Abbauproduktivität.

Die Abbauproduktivität der auf Trägermaterialien immobilisierten Biomasse wird submers in einer temperierten Meßzelle mit einer polarographischen Sauerstoffelektrode über die Atmungsrate bestimmt. Durch Bewegungen der in einem Trägermaterialbehälter aufgenommenen Biomasse, zusätzlich zum Rühren mit einem Magnetrührkern, werden die Immobilisate mit dem in der Meßlösung gelösten Sauerstoff und dem Substrat homogen durchmischt. Mit Mischsubstraten sind prinzipielle Leistungen der Mikroorganismen erfaßbar.

Aktivitätsbestimmung immobilisierter Mikroorganismen.

DE 197 14 219 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Bestimmung der Abbauproduktivität von immobilisierten Mikroorganismen.

- 5 Mit immobilisierten Mikroorganismen können Fremdstoffe aus Abluft, Abwasser und Böden biologisch abgebaut werden. Zur biologischen Abluftreinigung sind verschiedene Verfahren mit verschiedenen Trägermaterialien für Mikroorganismen im Einsatz. Gängige Apparate sind Biofilter, Biowäscher und Rieselbettreaktoren. Bisher mangelt es an Rahmendaten, die eine leistungsspezifische Auslegung der Apparate gestatten, um die aus industrieller Produktion in die Abluft emittierten, umwelt- und geruchsbelastenden Verbindungen mikrobiell zu eliminieren. Die Dimensionierung von
- 10 Abluftreinigungsanlagen erfolgt derzeit vorwiegend nach VDI-Richtlinie 3477 /1/. Die Effizienz von Abluftreinigungsanlagen wird bestimmt durch die biologische Abbauproduktivität und den Reaktortyp. Bisher konnte der Anteil der biologischen Abbauleistung an der Gesamtleistung bezüglich des Stoffüberganges vom Reaktortyp jedoch nicht differenziert werden.

- Einen Überblick über die Bestimmungsmethoden der mikrobiellen Aktivität gibt Alef /2/. Die Aktivität von Biomasse
- 15 kann bestimmt werden durch Methoden wie (i) meist der Atmungsaktivität, (ii) seltener der Aktivität unspezifischer Dehydrogenasen und (iii) der ATP-Konzentration oder (iv) vereinzelt der Wärmebildung mittels Mikrokalorimetrie. Die Bestimmung der Atmungsaktivität ist generell bevorzugt aus physiologischen und apparatetechnischen Gründen. Die Atmungsaktivität kann bestimmt werden mit O₂-Elektroden oder mit Respirometern (z. B. Warburg-Apparat, Sapro-mat).

- Zur Messung der Atmungsaktivität von Biofiltermaterial und anderer mikrobiologischer Untersuchungen, bei denen
- 20 der Sauerstoffverbrauch interessiert, wird bisher meist der Sapro-mat verwendet. Dieser ist für die Bestimmung des BSB₅ von Abwasserproben konzipiert. Die Bestimmung beruht auf der Messung des Sauerstoffverbrauchs während der Inkubation einer Probe in einem geschlossenen System. Der Sauerstoff wird dem System elektrochemisch nachgeliefert, so daß der Sauerstoff in dem über der Probe befindlichen Gasraum nicht verarmt. Die Messung ist abhängig vom Stoffübergang des Sauerstoffes von der Gasphase in die Flüssigkeitsphase. Der Sapro-mat besteht aus einem temperatureregelten Wasserbad mit den Meßeinheiten, einem Steuergerät und einer Auswerteeinheit, so daß die Messungen kontinuierlich registriert werden können. Der Kaufpreis des Gerätes ist mit derzeit ca. DM 60.000 sehr hoch. Der Einsatz dampfdruckverändernder Prüfsubstanzen ist problematisch, da scheinbare Sauerstoffverbrauchsraten gemessen werden können /3/.
- 25 Daher sind Kontrollen notwendig, die materialaufwendig durch erhöhte Anzahl von Meßplätzen und zeitaufwendig durch Meßvorbereitung sind. Der Prüfvorgang ist langwierig durch stundenlange Meßdauer. Bisher wurden die mit dem Sapro-mat ermittelten mikrobiellen Atmungsaktivitäten nicht mit der Abbauproduktivität der Mikroorganismen korreliert.

- Die Atmungsaktivität von suspendierten Mikroorganismen kann in einer Meßkammer (Rank Bros. Ltd., Cambridge, UK) mit integrierter Sauerstoffelektrode nach dem Clark-Prinzip (US patent 2913386) /4/ submers bestimmt werden. Die Bestimmung der substratabhängigen Atmungsaktivität von immobilisierten Mikroorganismen mit Sauerstoffelektroden ist bisher nicht beschrieben.

- 35 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Atmungsaktivität von immobilisierten Mikroorganismen unabhängig vom Stoffübergang von der Gas- in die Flüssigphase einfach, quantitativ, reproduzierbar, und kostengünstig zu bestimmen. Die Meßapparatur soll für den Einsatz dampfdruckverändernder, als auch schwer wasserlöslicher Verbindungen geeignet und transportabel sein. Die Atmungsaktivität soll mit der Abbauproduktivität der Mikroorganismen korrelierbar sein. Bei unbekannten Substraten sollen prinzipielle Leistungen der Mikroorganismen erfaßt werden können.

- 40 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die Atmungsaktivität von immobilisierten Mikroorganismen in einer temperierten Meßzelle mit integrierter Sauerstoffelektrode submers gemessen wird. Die Immobilisate werden in einem Trägermaterialbehälter aufgenommen. Der gelöste Sauerstoff wie das Substrat werden homogen durchmischt, indem die Flüssigkeit mit einem Magnetrührkern gerührt und der Trägermaterialbehälter vertikal bewegt wird. Optimal ist eine Hubfrequenz des Behälters von 0,35 s⁻¹ und eine Rührerdrehzahl von 700 rpm. Für die Messung sind
- 45 eine Polarisationsspannung der Sauerstoffelektrode von 0,78 V und eine Gesamtmeßdauer von 2–10 min geeignet. Die Temperatur der Meßflüssigkeit sollte 30°C betragen. Bei unbekannten Substraten werden prinzipielle Leistungen von Mikroorganismen mit einem Mischsubstrat erfaßt.

Literatur

- 50 /1/ VDI 3477. 1991. Biologische Abgas/Abluftreinigung – Biofilter. 12/91. In Verein Deutscher Ingenieure (ed.), VDI-Handbuch Reinhaltung der Luft, VDI-Verlag, Düsseldorf.
- /2/ Alef, K. 1991. Bestimmung der mikrobiellen Aktivitäten. In Alef K. (ed), Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie, ecomed-Verlag, Landsberg/Lech, pp. 61–148.
- 55 /3/ Riis, V., D. Miché und W. Babel (1996) Störungen durch flüchtige Substanzen bei der Messung des biologischen Sauerstoffverbrauches mit dem Sapro-mat. Acta hydrochim. hydrobiol. 24: 31–35.
- /4/ Clark, L.C. 1956. Electrochemical device for chemical analysis. US patent 2913 386.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand des Ausführungsbeispiels, wie es in der Fig. 1 dargestellt ist, näher erläutert.

- Die Meßanordnung besteht aus einer temperierbaren Glasmeßzelle (A) mit einer integrierten polarographischen Sauerstoffelektrode (B), die mit einem Spannungsgeber (C) und einem Schreiber (D) verbunden ist. Trägermaterial mit den
- 60 daran immobilisierten Mikroorganismen wird in dem Trägermaterialbehälter (E) aus rostfreiem Chromnickelstahl (1.4571) aufgenommen. Der Behälter (E) besteht aus einem Zylinder mit einem Boden und einem anschaubbaren Deckel aus Quadratmaschengewebe. Das Volumen des Trägermaterialbehälters kann durch Einschrauben von Zwischenringen vergrößert werden. Die Flüssigphase mit dem darin gelösten Sauerstoff wird homogen verteilt durch Rühren mit einem Magnetrührkern (F) und durch kontinuierliche Hubbewegung des Trägermaterialbehälters. Das Meßsignal ist proportional zum O₂-Partialdruck in der Meßlösung. Der Behälter wird durch eine Kolbenstange (G), die an eine rotierende Scheibe (H) gekoppelt ist, vertikal bewegt. Der Antrieb erfolgt durch einen Motor (I), dessen Drehzahl über einen Motorregler (K) eingestellt werden kann. Die Hubamplitude und die Hubfrequenz sind stufenlos verstellbar. Die luftblasen-
- 65

frei gefüllte Meßkammer wird über einen Stempel (L) mit kapillarem Steigrohr einschließlich einer Injektionsöffnung (M) nach außen hin abgeschlossen. Das Meßvolumen ist durch Veränderung der Stempelhöhe variierbar.

Der Meßansatz beinhaltet sauerstoffgesättigten, geeigneten Puffer, z. B. 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.2 und an Trägermaterial immobilisierte Mikroorganismen. Gemessen wird die Atmungsaktivität bei 30°C. Das Substrat wird in geeigneter (mM) Konzentration eingesetzt. Die substratabhängige Sauerstoffverbrauchsrate (v) wird aus dem Volumen des Puffers (P_v), dessen Sauerstoffkonzentration und der linearen pO_2 -Abnahme über die Zeit bestimmt (Gleichung 1).

$$(1) \quad v \text{ (}\mu\text{mol O}_2\text{/min)} = \frac{P_v \cdot 0.235 \mu\text{mol O}_2\text{/ml}}{\text{min}}$$

Die spezifische Aktivität wird ausgedrückt als verbrauchter Sauerstoff pro Gewichtseinheit Protein, die volumetrische Aktivität wird auf das Schüttvolumen des verwendeten Trägermaterials bezogen.

Mit der beschriebenen Apparatur wurden die Atmungsraten von Mischkulturen zum Abbau von n-Butanol, Toluol und Dichlormethan, die auf Tongranulat, Polyamid-Kugeln, gesintertem Styropor oder Aktivkohle immobilisiert waren, vermessen. Dazu wurden bis zu 10 cm³ bewachsenes Trägermaterial und 8 mM n-Butanol oder 5 mM Toluol oder 5 mM Dichlormethan eingesetzt. Ebenfalls wurden die Atmungsaktivitäten von bis zu 150 cm³ Biofiltermaterial aus industriellen Abluftreinigungsanlagen mit einem Mischsubstrat aus je 2 mM Glukose, Succinat, Pyruvat, Laktat und Acetat bestimmt. Spezifische Atmungsraten bis zu 1.2 $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ wurden gemessen. Die volumetrischen Atmungsraten der Mikroorganismen korrelierten mit den spezifischen Abbauraten gemäß der Beladung des Trägermaterials mit den immobilisierten Mikroorganismen.

Die erzielten Vorteile der Erfindung sind:

- Mit dem entwickelten Meßverfahren kann über die Atmungsaktivität von immobilisierten Mikroorganismen deren Abbauaktivität bestimmt werden.
- Die Immobilisate werden in einem Trägermaterialbehälter aufgenommen und werden durch dessen Bewegung sowie durch Rühren der Meßlösung mit einem Magnetrührkern homogen mit dem in der Meßlösung gelösten Sauerstoff und dem Substrat durchmischt.
- Der Stoffübergang gas-flüssig/flüssig-gas entfällt, da das Substrat der Flüssigphase zugegeben wird, in der der Sauerstoff gelöst vorliegt.
- Die Meßergebnisse sind quantitativ und reproduzierbar innerhalb von 2–10 min zu ermitteln.
- Dampfdruckverändernde, als auch schwer wasserlösliche Verbindungen können als Substrate eingesetzt werden.
- Die gesamte Meßeinheit ist transportabel und kostengünstig in der Anschaffung.

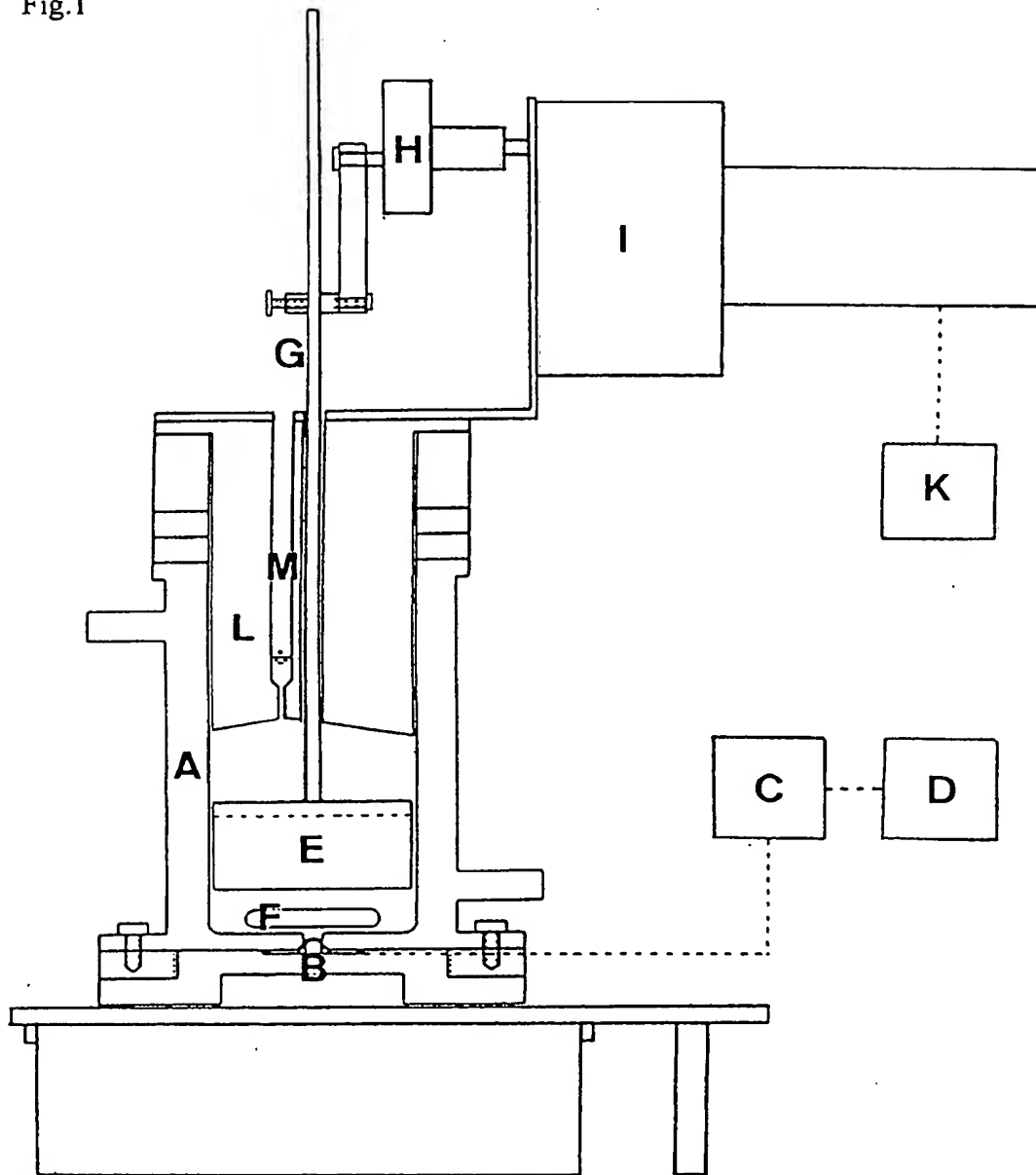
Mit dem vorgestellten Meßsystem zur Bestimmung der mikrobiellen Atmungsaktivität erzielte Ergebnisse sind im Anlagenbau für die Dimensionierung von Abluftreinigungsanlagen bedeutungsvoll. Ebenfalls kann das Meßverfahren zur Überwachung von Anlagen zur biologischen Abluftreinigung eingesetzt werden. Im Rahmen mikrobiologischer Verfahren zur Sanierung von Böden ist die Abbauaktivität neben der chemischen Analyse des Schadstoffes direkt nachprüfbar. Die mikrobiologische Atmungsaktivität aus Bodenproben ist bestimmbar.

Patentansprüche

1. Verfahren und Vorrichtung zur Aktivitätsbestimmung immobilisierter Mikroorganismen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die mikrobielle Atmungsaktivität submers bestimmt wird in einer temperierbaren, luftblasenfrei verschließbaren Meßzelle mit integrierter Sauerstoffelektrode und mit homogener Durchmischung der in einem Trägermaterialbehälter aufgenommenen Immobilisate mit dem in der Meßlösung gelösten Sauerstoff und dem Substrat mittels Bewegung der fixierten Biomasse.
2. Verfahren und Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die mikrobielle Atmungsaktivität unter Substratsättigung (nach Michaelis-Menten) gemessen wird.
3. Verfahren und Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß flüchtige, schwer wasserlösliche und leicht wasserlösliche Verbindungen beziehungsweise Mischsubstrate eingesetzt werden.
4. Verfahren und Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßzelle aus Glas gefertigt ist.
5. Verfahren und Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bewegung des Trägermaterialbehälters eine Auf- und Abwärtsbewegung ist.
6. Verfahren und Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Hubfrequenz und die Hubamplitude des Trägermaterialbehälters stufenlos verstellbar sind.
7. Verfahren und Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Immobilisate zusätzlich durch Rühren mit einem Magnetrührkern mit Meßlösung durchmischt werden.
8. Verfahren und Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Meßvolumen variiert werden kann.
9. Verfahren und Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägermaterialbehälter modular aufgebaut ist und das Volumen verändert werden kann.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

Fig.1



A Meßzelle
B Sauerstoffelektrode
C Spannungsgeber
D Schreiber
E Trägermaterialbehälter
F Magnetrührkern

G Kolbenstange
H rotierende Scheibe
I Motor
K Motorregler
L Stempel
M Injektionsöffnung

Quantification of metabolic activity of immobilised microorganisms

Publication number: DE19714219

Publication date: 1998-10-08

Inventor: FRIEDRICH CORNELIUS PROF DR (DE); HEINZE UTE (DE)

Applicant: FRIEDRICH CORNELIUS PROF DR (DE); HEINZE UTE (DE)

Classification:

- **International:** **C12M1/34; C12Q1/02; C12M1/34; C12Q1/02; (IPC1-7):**
C12Q1/00; C12M1/34; C12Q1/02

- **European:** C12M1/34B; C12Q1/02

Application number: DE19971014219 19970407

Priority number(s): DE19971014219 19970407

Report a data error here

Abstract of **DE19714219**

Process and apparatus for determining the metabolic activity of immobilised microorganisms are claimed. The novel feature is submerged measurement, in a temperature-controlled, sealed measurement cell, free of air bubbles. The cell contains an integral oxygen electrode. Oxygen dissolved in the measurement solution, is homogeneously mixed with the substrate and immobilised material contained in the vessel, by moving the fixed biomass about.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide